

ミルベマイシンオキシム・プラジカンテル併用による北海道とヨーロッパで分離された多包条虫に対する有効性の比較

Comparative Study on *in vitro* Effectiveness of Milbemycin Oxime/Praziquantel Combination Treatment against *Echinococcus multilocularis* Isolated in Hokkaido, Japan and Europe

孝口 裕一 入江 隆夫 八木 欣平

Hirokazu KOUGUCHI, Takao IRIE and Kinpei YAGI

Key words : *Echinococcus multilocularis* (多包条虫) ; Hokkaido isolate (北海道分離株) ; praziquantel (プラジカンテル) ; milbemycin oxime (ミルベマイシンオキシム)

北海道におけるエキノコックス症は、多包条虫 (*Echinococcus multilocularis*) の幼虫寄生によるもので、毎年10~30人の新規患者が発生している¹⁾。本寄生虫疾患には未だ著効を示す薬剤が開発されておらず、根治療法は病巣の外科的切除のみであることから、早期診断に加え、媒介動物からの感染予防が重要な課題となっている。北海道でのエキノコックスの生活環は野生のキツネと野ネズミの間で維持されているが、イヌも感染野ネズミを捕食した場合、キツネと同じように小腸内にエキノコックスの成虫を宿し、糞便と共に人の感染源となる虫卵を排出する。北海道内のイヌのエキノコックス感染率は0.4~1%と報告されており^{2,3)}、道内の登録犬の頭数から推定すると、800~2,000頭もの感染イヌが道内に存在することになる。道内においてイヌは、本寄生虫の生活環の維持に重要とは考えられていないが、人と飼いイヌとの濃厚な接触頻度を考慮すると、イヌの感染は飼い主はもとより、その家族・地域住民にとって大きな感染リスクとなる。

近年、飼いイヌと共に道内と本州を往来する旅行者等も増加しており⁴⁾、昨年には本州で2例目となるエキノコックス感染イヌが報告された⁵⁾。イヌのエキノコックスは、条虫駆虫薬であるプラジカンテル (以下PZと記す) を用いて効果的に駆虫できる。従って、飼いイヌからのエキノコックス感染は駆虫薬の定期的投与により、効果的に予防できると考えられる。近年、ヨーロッパにおいても多包条虫の汚染地域は拡大しており、駆虫薬の使用を含めた適切な飼いイヌの飼育が推奨されているが^{6,7)}、国内では飼いイヌへの条虫駆虫薬の定期的な投与はほとんど普及していない。一方、犬糸状虫症 (フィラリア症) はわが国の飼いイヌの重要な循環器系疾患として位置づけられており、その予防薬の定期的投与は全国で広く行われている⁸⁾。ミルベマイシンオキシム (以下MBと記す) は、条虫に対す

る駆虫作用は示さないが、フィラリア症の予防薬として広く使用される抗蠕虫薬である⁹⁾。MBを配合したPZ合剤駆虫薬はフィラリア症を予防するために飼い主が積極的に利用することが期待でき、同時に多包条虫の定期的駆虫を実施できるという利点がある。このことからエランコジャパン株式会社 (旧ノバルティスアニマルヘルス㈱) によって開発が進められた。

平成25年、この合剤は動物用医薬品として国内で製造販売承認された。本合剤の開発当初、ヨーロッパ地域で分離された多包条虫を用いて有効性が確認されたが、国内分離株を用いた試験は行われていなかった。本研究では、北海道で分離された多包条虫に対するMB/PZ併用の影響を確認し、本合剤の両株に対する効果とその有効性を比較した。

方 法

1. 供試株

当所で維持継代されている、北海道根室市で分離された根室株及びヨーロッパ株の多包条虫を本研究に用いた。後者はDr. Auer (オーストリア、ウィーン大学) から分与された¹⁰⁾。

2. 原頭節の培養

多包条虫の原頭節は、以前に我々が報告した方法¹¹⁾に従って精製した。DMEM high glucose培地 (Gibco社製) にウシ胎児血清 (Thermo scientific社製) を終濃度10%となるように加え、さらに抗生物質 (PenStrep, Gibco社製) をペニシリン終濃度100 U/mL及びストレプトマイシン終濃度100 µg/mLとなるようそれぞれ添加し、培養液を作製した。細胞培養用24ウェルプレートに、両株の原頭節をそれぞれ、1,200個/0.5 mL/ウェルとなるように培養液に懸濁し、一晩あるいは2日間、37°Cで培

養した。培養後、原頭節が翻転し、両株ともに活発な運動を開始したことから、これらを幼弱成虫とした。

3. 薬剤添加と形態観察

PZ (Sigma 社製) 及び MB (アルプス薬品工業社製) の混合比が製剤と同じ 10 : 1 となるように、それぞれ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及び 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のジメチルスルホキシド溶液を作製した。その後、培養液を用いて PZ 及び MB 濃度がそれぞれ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及び 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように希釈した溶液を添加原液とした。

添加原液を培養液で 10 倍段階希釈し、幼弱成虫を含む培養液中に、PZ 終濃度 (MB 終濃度) 1.0 (0.1), 0.1 (0.01), 0.01 (0.001) あるいは 0.001 (0.0001) $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加した。添加直後に位相差顕微鏡 (オリンパス社製, CK2) を用いて幼弱成虫の形態観察を行った。

結果及び考察

両株ともに 1.0 (0.1) 及び 0.1 (0.01) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加群において、幼弱成虫の急激な運動性喪失に加えて全体的に丸みを帯びる顕著な形態変化を認めた (図 1)。一方、0.01 (0.001) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下ではこのような変化は認められなかった。

さらに、0.1 (0.01) $\mu\text{g}/\text{mL}$ の薬剤添加液を培養液で 2 倍段階希釈し、PZ 終濃度 (MB 終濃度) 0.05 (0.005), 0.025 (0.0025) あるいは 0.0125 (0.00125) $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように、幼弱成虫を含む培養液に添加した。その結果、0.05 (0.005) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加群において、前述したような変化が認められたが、0.025 (0.0025) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下では両株ともに明らかな変化は認められなかった。

今回の *in vitro* における PZ 感受性の評価では、それぞれの株の幼弱成虫ともに、0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ という同じ PZ 濃度において全体的に丸みを帯びる著しい形態変化を引き起こし、株間の差を認めることはなかった。

1.0 (0.1) や 0.1 (0.01) $\mu\text{g}/\text{mL}$ などの高濃度添加群にお

いて、幼弱成虫は著しい形態変化を引き起こしたが、わずかに運動性を残した。このような観察結果は、過去の報告における単包条虫の原頭節を用いて行われた実験結果と一致している^{12,13)}。すなわち、同様に処理された虫体は、PZ 処理により、死滅することはなく、形態が変化 (収縮) した。またこれらの報告において、PZ 処理により虫体の *in vivo* における増殖能が著しく低下するという記載がある。以上のことから、本試験においても形態の変化を事実上の薬剤の有効性の指標とした。

PZ の条虫に対する薬理として、1) 外皮の空胞化を引き起こし、それによって外皮が破壊され内容物が虫体外に放出される、2) 虫体の無機イオンの正常な出入りを妨害し、 Ca^{2+} や Na^{+} が過度に虫体内に入ることにより痙攣や収縮が起こる、3) 虫体のグルコースの吸収を抑制し、さらに乳酸塩の排泄量を増加させて虫体の栄養素代謝を阻害することなどが知られている。今回観察された虫体の形態変化は、前述した PZ の作用によると考えられる。

以上の結果、根室株とヨーロッパ株に対する本合剤の有効性には差が認められず、本合剤がわが国に分布する多包条虫にも有効であると考えられた。

稿を終えるにあたり、本研究を共同で行っていただいた、エランコジャパン(株)の皆様に深謝いたします。

文 献

- 1) 国立感染症研究所ホームページ：発生動向調査年別報告数一覧 (全数把握) 四類感染症 (全数), <http://www.nih.go.jp/niid/ja/survei/2085-idwr/ydata/5672-report-ja2014-20.html> (確認：2016 年 6 月 3 日)
- 2) 神谷正男：犬のエキノコックス症対策ガイドライン 2004—一人のエキノコックス症予防のために—。厚生労働科学研究費補助金 (新興・再興感染症研究事業) 動物由来寄生虫症の流行地拡大防止対策に関する研究平成 16 年度報告書, 厚生労働省, 東京, 平成 16 年 12 月, pp.1-23
- 3) Nonaka N, Kamiya M, Kobayashi F, Ganzorig S, Ando S, Yagi K, Iwaki T, Inoue T, Oku Y: *Echinococcus multilocularis* Infection in Pet Dogs in Japan. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 9, 201-206 (2009)
- 4) Doi A, Matsuda H, Uchida A, Kanda E, Kamiya H, Konno K, Tamashiro H, Nonaka N, Oku Y, Kamiya M: Possibility of invasion of *Echinococcus* into Honshu with pet dogs from Hokkaido and overseas. *Nippon Koshu Eisei Zasshi*, 50, 639-649 (2003)
- 5) 登丸優子, 福本真一郎, 森嶋康之: 本州以南第 2 例目の届出となった犬のエキノコックス (多包条虫) 症—愛知県, 病原微生物検出情報, 35, 183 (2014)
- 6) Gottstein B, Stojkovic M, Vuitton DA, Millon L, Marcinkute A, Deplazes P: Threat of alveolar echinococcosis to public health—a challenge for Europe. *Trends Parasitol.*, 31, 407-412 (2015)
- 7) ESCCAP: ESCCAP Guideline 01 Worm Control in Dogs and Cats, Second Edition, United Kingdom, 2010
- 8) 北川 均, 佐々木栄英, 西飯直仁, 鬼頭克也: 犬糸状虫症. *日本獣医師会雑誌*, 67, 597-602 (2014)
- 9) ESCCAP: ESCCAP Guideline 5 Control of Vector-Borne Diseases in Dogs and Cats Second Edition, United

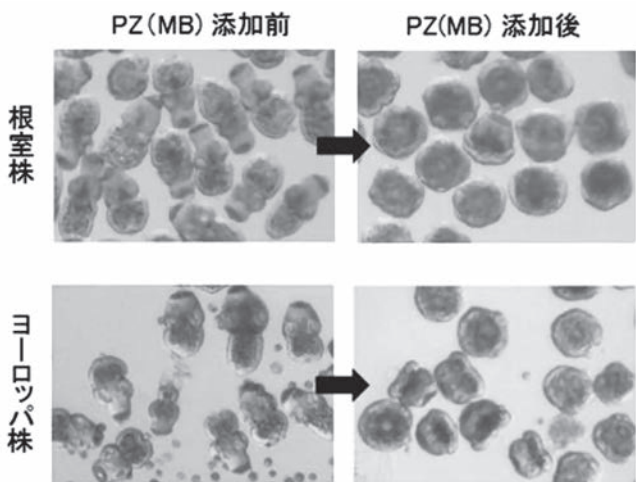


図 1 培養後の幼弱成虫及び PZ (MB) : 1.0 (0.1) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加後の形態変化

Kingdom, 2012

- 10) 八木欣平, 伊藤拓也, 川瀬史郎, 高橋健一: ヨーロッパ株多包条虫の虫卵を介したイヌーコトナラットによる継代の確立と PCR-RFLP による株の同定. 道衛研所報, 51, 72-75 (2001)
- 11) 孝口裕一, 山野公明: 初代幼虫シストを用いたエキノコックス症血清診断用抗原成分のロット間差. 道衛研所報, 62, 95-97 (2012)
- 12) Richards KS, Morris DL, Daniels D, Riley EM:

Echinococcus granulosus: the effects of praziquantel, *in vivo* and *in vitro*, on the ultrastructure of equine strain murine cysts. Parasitology, 96, 323-336 (1988)

- 13) Richards KS, Riley EM, Taylor DH, Morris DL: Studies on the effect of short term, high dose praziquantel treatment against protoscoleces of ovine and equine *Echinococcus granulosus* within the cyst, and *in vitro*. Trop. Med. Parasitol., 39, 269-272 (1988)